# Keanekaragaman Bakteri Tanah dari Teluk Kodek Area, Pamenan Lombok Barat

Tri Ratna Sulistiyani
*Pusat penelitian Biologi, Lembaga Ilmu Penelitian Indonesia,*
*Jalan Raya Bogor-Jakarta Km. 46, Cibinong 16911 Indonesia*
*E-mail: tri_ratna83@yahoo.com*

*Diterima Januari 2011 disetujui untuk diterbitkan September 2011*

**Abstract**

Indonesia is the center of the world's biodiversity with a unique biodiversity and priceless. To explore and get more information about biodiversity, strategic research was needed. The objective of this reseach was to explore the population diversity of soil microbes in Lombok Island. Bacterium isolates was identified by molecular 16S rDNA. Soil samples from 5 different sites in Lombok Island showed various bacteria population. The highest population 113 x 106 CFU/g soil was found in soil sample around *Plumeria acuminata* and the lowest 34 x 106CFU/g soil was found in soil sample around *Tamarindus indica* tree. Fourteen of isolates were identified using molecular identification with homology from 94 – 100%.

**Keywords:** biodiversity, soil microbes, identification

**Abstrak**

Indonesia merupakan pusat keanekaragaman hayati dunia yang memiliki biodiversitas yang unik dan tak ternilai harganya. Untuk menggali dan menambah informasi keanekaragaman tersebut, diperlukan serangkaian penelitian yang strategis. Penelitian ini bertujuan untuk menggali keanekaragaman mikroba tanah dari berbagai lokasi di Pulau Lombok melalui pendekatan molekuler sekuensing 16S rDNA. Sampel tanah dari 5 lokasi yang berbeda di pulau Lombok memiliki populasi bakteri yang bervariasi. Populasi bakteri tertinggi sebanyak 113 x $10^6$ CFU/g tanah terdapat pada perakaran tanaman *Plumeria acuminata* (kamboja gajah) dan terendah pada tanah yang berada pada perakaran tanaman *Tamarindus indica* sebanyak 34 x $10^6$ CFU/g tanah. 14 dari isolat terisolasi telah teridentifikasi secara molecular 16S rDNA dengan tingkat homologi dari 94-100%.

**Kata kunci:** biodiversitas, mikroba tanah, identifikasi

## Pendahuluan

Pulau Lombok merupakan salah satu pulau kecil yang memiliki topograpi yang berbukit, dataran tinggi, serta sedikit dataran yang luas. Pulau ini memiliki tingkat keanekaragaman hayati yang cukup tinggi. Keanekaragaman flora dan fauna di pulau ini lebih menunjukkan kemiripan dengan flora dan fauna yang dijumpai di Australia daripada Asia. Usaha penggalian sumber daya hayati terutama mikroorganisme bakteri terus dilakukan dalam rangka menggali dan menambah informasi keanekaragaman hayati yang ada di Pulau Lombok.

Bakteri tanah memiliki peran yang sangat penting dalam siklus kehidupan di bumi dan merupakan salah satu mikroba yang paling melimpah di alam. Dalam kehidupan, mikroba memiliki banyak manfaat diantaranya berperan dalam siklus karbon, siklus nitrogen, proses daur ulang sulfur, fosfor, besi dan banyak mikronutrien lain, serta penghasil antibiotik seperti aktinomicestes. Selain itu mikroorganisme juga bermanfaat dalam bioremediasi yaitu penggunaan mikroorganisme untuk mendetoksifikasi dan menguraikan zat berbahaya dalam lingkungan.

Dalam tanah bakteri juga berfungsi sebagai penghasil hormon tumbuh seperti Indol Acetic Acid (IAA), sitokinin, giberelin agen biokontrol, yang pada akhirnya dapat meningkatkan kesuburan tanah. Salah satu bakteri tanah yang menguntungkan adalah *Pseudomonas* . Bakteri ini memiliki kemampuan sebagai agen biokontrol, pendegradasi limbah-limbah pencemar lingkungan, dan mampu tumbuh pada kondisi yang ekstrim (Hasanudin 2003,

Purwaningsih 2004, Durrani 2008).

Sebagai upaya untuk mengetahui keberadaan bakteri dari tanah tersebut diatas, maka dilakukan penelitian dan isolasi bakteri dari tanah berbagai lokasi dan perakaran tanaman. Hasil penelitian ini diharapkan dapat menambah informasi dan koleksi bakteri terutama genus *Pseudomonas* dari sampel tanah.

## Bahan dan Metode

### *Isolasi bakteri dari tanah*

Isolasi bakteri dilakukan dengan metode seri pengenceran dengan menggunakan larutan fisiologis NaCl 0,85%. Sebanyak 1g tanah ditimbang dan dimasukkan ke dalam tabung reaksi yang telah berisi larutan fisiologis 9 ml sampai diperoleh seri pengenceran 10-1-10-5. Masing-masing dari seri pengenceran 10-3-10-5 diambil 100 µl dan dimasukkkan ke dalam cawan petri yang berisi media Difco *Pseudomonas* Agar F. Susupensi diratakan di atas permukaan lempengan agar dengan spatula dan selanjutnya diinkubasi pada temperatur 27°C. Koloni yang tumbuh diamati dan dihitung jumlahnya dengan cara mengalikan faktor pengenceran yang digunakan. Proses selanjutnya adalah purifikasi yang dimaksudkan untuk memperoleh isolat murni.

### *Identifikasi bakteri melalui pendekatan molekuler*

### *Ekstraksi DNA*

Untuk mendapatkan sel, bakteri dapat ditumbuhkan di media padat atau media cair. Pemanenan sel dari media padat dilakukan dengan mengumpulkan sel yang ada dipermukaan agar menggunakan ose dan ditempatkan di tabung eppendorf 1.5 ml, sedangkan pemanenan sel dari media cair dilakukan dengan sentrifuse pada kecepatan 3000xg selama 15-30 menit. Sel yang telah dipanen dibilas menggunakan 1 ml bufer TE dan disentrifugasi 10000 rpm, selama 15 menit.

Sel yang telah dipanen selanjutnya dipecah menggunakan 50 µl lisozim (50µg/ml). Kocok hingga homogen dan inkubasi 37°C selama 30 menit. Untuk melarutkan protein membran dan enzim, ditambahkan pereaksi GES sebanyak 250 µl. Homogenkan hingga larut sempurna dan inkubasi selama 10 menit pada temperatur ruang. Dilanjutkan dengan penambahan 125 µl ammonium acetate 7.5 M dan ditempatkan dalam es selama 10 menit.

Pemisahan DNA dari protein dan polisakarida dilakukan dengan menambahkan 500 µl kloroform ke dalam larutan, dibolak-balik 50 kali, dan disentrifuse pada kecepatan 10000 rpm selama 10 menit. Setelah selesai sentrifus akan terbentuk 3 lapisan dan DNA berada pada lapisan paling atas. DNA diambil menggunakan pipet tumpul dan ditempatkan ke eppendorf yang baru. Untuk membentuk benang-benang DNA, ke dalam larutan DNA ditambahkan isopropanol setengah dari volume larutan DNA, kemudian dibolak-balik sampai terlihat benang-benang DNA. Sentrifuse pada kecepatan 10000 rpm selama 5 menit hingga benang-benang DNA mengendap. Selanjutnya endapan DNA dicuci dengan etanol 70 % dingin. Sentrifuse kembali dan buang supernatan. DNA dikeringanginkan selama 10 menit, dilarutkan dalam 100 µl 0.2X bufer TE, dan selanjutnya konsentrasi DNA diukur menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 260 nm.

*Amplifikasi PCR 16S rDNA*

Amplifikasi 16S rDNA dilakukan menggunakan GoTaq (Promega) dengan primer 20F dan 1500R, dengan komposisi 8.75 µl Ultrapure water, 12.5 µl GoTag Green Master Mix 2X, 0.625 µl primer 20F (10 µM), 0.625 µl primer 1500F (10 µM), 0.5 µl DMSO, dan 2 µl sampel DNA dengan total volume 25 µl. Amplifikasi dilakukan dengan kondisi PCR 95 C selama 3 menit, dilanjutkan (95C, 30 detik denaturasi; 50°C, 30 detik annealing; 72°C, 90 detik elongasi) 30 siklus dan final extension pada 72°C, 10 menit .

*Elektroforesis*

Sebanyak 3 µl dari produk PCR dianalisis menggunakan gel agarose 1% dengan aliran listrik bertegangan 100 V selama 30 menit. Setelah selesai, gel direndam dalam larutan etidium bromida 0.5 µl/mL selama 30 menit dan dibilas menggunakan bufer TAE 1X. Hasil elektroforesis dilihat menggunakan alat gel documentation.

*Purifikasi produk PCR*

Purifikasi produk PCR dilakukan dengan *PEG precipitation method* (Hirashi *et*

*al.*, 1995). Produk PCR ditambah dengan 15 µl larutan PEG (40% PEG 6000 dalam 10 mM $MgCl_2$) dan 6 µl 3 M sodium asetat. Kocok selama 10 menit pada temperatur kamar, kemudian disentrifugasi pada kecepatan 16.000 rpm selama 25 menit. Endapan DNA yang terbentuk dicuci 2 kali dengan etanol 70% dan dikeringanginkan selama 10 menit. DNA dilarutkan dalam 20 µl milli-Q dan dilanjutkan dengan *cycle sequencing*.

C*ycle sequencing*

Produk PCR yang yang telah dipurifikasi dilanjutkan dengan C*ycle sequencing*. Komposisi *cycle sequencing* 0.5 µl BDT Rrmix, 1.75 µl 5X Seq buffer, 0.5 µl Seq primer (10 µM) dengan primer 520F (5'-

GTGCCAGCAGCCGCGG-3') dan 920R (5'GTCAATTCCTTTGAGTTT-3'), 1.0 µl produk PCR, dan 6.25 µl Ultrapure water. *cycle sequencing* dilakukan pada kondisi 95 C selama 1 menit, dilanjutkan 40 siklus (95C, 10 detik denaturasi; 50°C, 5 detik annealing; 60°C, 90 detik elongasi) dan dilanjutkan pada 4°C.

Hasil *cycle sequencing* dipurifikasi kembali dengan *Ethanol purification method*. Produk *cycle sequencing* ditambah 1 µl EDTA 125 mM, 1 µl natrium asetat 3 M, dan 25 µl etanol 99%. Kocok hingga homogen, inkubasi pada temperatur kamar selama 15 menit dan disentrifus pada kecepatan 16000 rpm selama 25 menit 4 °C. Endapan DNA selanjutnya dicuci dengan etanol 70%, disentrifuse kembali dan endapan DNA dikeringanginkan 10 menit.

Urutan basa nitrogen dibaca menggunakan *automated DNA sequencer* (ABI PRISM 3130 Genetic Analyzer) (Applied Biosystems). Data hasil sekuensing selanjutnya diolah dengan program Bioedit, Clustalx, dan Njplot. Data yang diperoleh dicari homologinya atau dicocokkan dengan bank data DNA yang ada secara online di internet (www.ddbj.nig.ac.jp; www.ncbi.nlm.nih.gov).

**Hasil dan Pembahasan**

Bakteri mendapat banyak perhatian karena mampu tumbuh dengan cepat dan dapat mendekomposisi berbagai substrat yang ada di alam. Kepadatan dan komposisi bakteri dalam suatu lingkungan sangat dipengaruhi oleh kondisi lingkungan, antara lain kelembaban, aerasi, temperatur, keasaman, kandungan zat organik, dan anorganik. Keadaan iklim terutama curah hujan juga berpengaruh terhadap perkembangan mikoorganisme dalam tanah. P. Lombok memiliki curah hujan sebesar 1.500 mm per tahun, sehingga tanahnya mempunyai tingkat kesuburan yang cukup baik, yang memungkinkan bakteri tumbuh dengan baik (WWF Indonesia, mendatangkan Dewi Sri di Pulau Lombok, 13 Juli 2010). Tanah yang mendapat aerasi cukup, bakteri dan fungi akan tumbuh dominan, sedangkan lingkungan yang mengandung sedikit atau tanpa oksigen, bakteri akan berperan terhadap hampir semua perubahan biologis dan kimia lingkungan tanah.

Hasil isolasi menunjukkan bahwa populasi bakteri bervariasi pada masing-masing sampel tanah yang diamati (Tabel 1.). Hasil isolasi bakteri dari 5 titik sampling menunjukkan bahwa populasi bakteri lebih banyak terdapat pada sampel yang ditumbuhi tanaman dibandingkan sampel yang tidak ditumbuhi oleh tanaman. Sampel tanah di sekitar pohon *Plumeria acuminata* (kamboja gajah) memiliki populasi bakteri tertinggi dibandingkan dengan sampel tanah yang lain yaitu sebanyak 113 x $10^6$ CFU/g tanah dan terendah pada sampel tanah yang berada pada perakaran tanaman *Tamarindus indica* sebanyak 34 x $10^{-5}$CFU/g tanah. Perbedaan populasi ini dipengaruhi oleh kondisi lingkungan sampel yang diambil. Eksudat dari akar kamboja berperan sebagai substrat dan nutrisi yang bagus bagi pertumbuhan dan aktivitas bakteri yang ada di perakaran tanaman tersebut. Sedangkan sampel dari perakaran tanaman *Tamarindus indica* menunjukkan populasi bakteri yang terendah dikarenakan tanaman tersebut menghasilkan senyawa metabolit sekunder yang kemungkinan bersifat antimikroba sehingga kelangsungan hidup mikroba di sekitar perakaran tanaman tersebut menjadi terganggu (Doughari, 2006). Daun *Tamarindus indica* mengandung senyawa kimia terpenoid, saponin, flavonoid, dan asam-asam organik, sedangkan buahnya Buah polong asam jawa mengandung senyawa kimia antara lain asam appel, asam sitrat, asam anggur, asam tartrat, asam suksinat, pectin dan gula invert. Diduga senyawa-senyawa inilah yang

mempengaruhi kelimpahan jumlah mikroba di perakaran tanaman *Tamarindus indica* menjadi lebih sedikit dibandingkan tanaman yang lain (Hertiani, 2002). Apabila dibandingkan dengan sampel-sampel yang lain, sampel tanah dari pantai senggigi dengan kondisi lingkungan berupa tanah dan bebatuan menunjukkan populasi bakteri yang sedikit. Hal ini kemungkinan disebabkan tidak tersedianya sumber substrat dan nutrisi yang penting bagi pertumbuhan bakteri.

Tanah yang ditumbuhi tanaman memiliki kandungan bahan organik dan unsur hara makro lebih tinggi dibandingkan tanah tanpa tumbuhan. Tanah yang ditumbuhi pohon mengandung bahan organik atau unsur C yang umumnya di atas 2.5%, sedangkan C pada tanah tidak ada tumbuhan pohon tetapi didominasi alang-alang adalah di bawah 0.7%. Hal ini disebabkan antara lain bahan organik yang dihasilkan pohon lebih mudah mengalami perombakan dan bahan organik ini dihasilkan dalam jumlah banyak sehingga cukup tersedia untuk pertumbuhan dan perkembangan mikroba tanah (Purwaningsih 2004).

Wiley, 1961, mengemukakan bahwa jumlah bakteri di daerah perakaran tanaman berlimpah hingga $10^9$ sel pergram tanah. Kenyataan ini menunjukkan bahwa tanah yang ditumbuhi aneka tumbuhan tentunya mengandung bahan organik dalam jumlah yang memadai yang sangat dibutuhkan untuk kelangsungan hidup bakteri.

Setiap mikroorganisme akan tumbuh dengan baik dalam lingkungannya selama kondisi tersebut menguntungkan bagi pertumbuhan dan pertahanan dirinya, sama halnya dengan mikroba-mikroba yang ada di dalam tanah. Begitu terjadi perubahan fisik atau kimiawi, seperti habisnya nutrien atau terjadinya perubahan radikal dalam hal temperatur atau pH, yang membuat kondisi bagi pertumbuhan spesies lain lebih menguntungkan, maka organisme yang telah teradaptasi dengan baik dalam keadaan tanah terdahulu terpaksa menyerahkan tempatnya kepada organisme yang dapat beradaptasi dengan baik dalam kondisi yang baru itu.

Tabel 1. Jumlah bakteri total dari beberapa sampel tanah di Pulau Lombok
Table 1. Total number of bacteria from some soil samples in Lombok Island

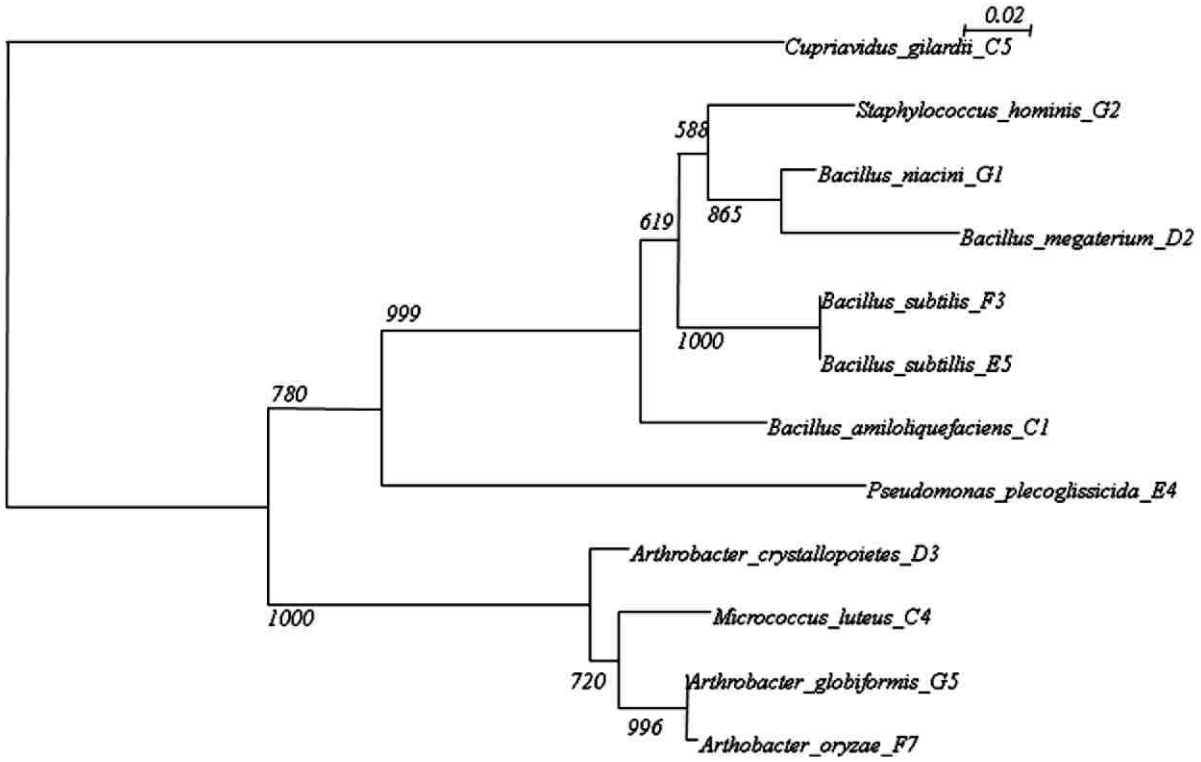
| Kode sampel | Asal sampel | Kode isolate | Jumlah bakteri total ($10^6$) |
|---|---|---|---|
| LS 01 | Pantai senggigi, teluk kodek | C | 42 |
| LS 02 | Sekitar pohon *Mangifera indica (mangga)* | D | 76 |
| LS 03 | Sekitar tanaman *Anacardium occidentale* (jambu monyet) | E | 81 |
| LS 04 | Sekitar pohon *Tamarindus indica* (asam jawa) | F | 34 |
| LS 05 | Sekitar pohon *Plumeria acuminata (kamboja gajah)* | G | 113 |

Gambar 1. Hasil isolasi sampel tanah dari Pulau Lombok
Figure 1. Results of soil sample isolation from Lombok Island

Isolasi dilakukan menggunakan media *Pseudomonas Agar F* dengan harapan bakteri yang terisolasi termasuk dalam genus *Pseudomonas* atau kelompok bakteri gram negatif. Berdasarkan hasil identifikasi melalui pendekatan molekuler dengan sekuensing 16S rDNA menunjukkan bahwa populasi bakteri yang terisolasi terdiri dari beberapa genus bakteri (Table 2). Tidak semua bakteri yang terisolasi merupakan bakteri genus *Pseudomonas* , hampir 83% bakteri terisolasi merupakan bakteri non genus *Pseudomonas* . Pada gambar 2 dapat diamati hubungan kekerabatan antar isolat yang diperoleh. Hampir 35% bakteri yang teridentifikasi merupakan genus *Bacillus* dimana kelompok bakteri ini berperan dalam proses dekomposisi kitin (Lyla dan Ajmal, 2006). Spesies *Bacillus* merupakan sapropit tanah yang tersebar luas di seluruh dunia. Spora dari *Bacillus* dapat bertahan 60 tahun atau lebih di bawah kondisi lingkungan yang keras. Selain *Bacillus* genus yang juga banyak teridentifikasi adalah *Arthrobacter. Arthrobacter* merupakan genus yang tersebar luas di tanah, hal ini disebabkan *Arthrobacter* mampu memproduksi berbagai enzim yang dapat memetabolisme berbagai substansi yang ada di tanah, termasuk organopospat. Genus *Pseudomonas* merupakan salah satu genus bakteri yang tersebar luas di tanah selain arthrobacter. Beberapa bakteri tanah termasuk genus *Pseudomonas* memiliki kemampuan untuk melarutkan P organic menjadi bentuk fosfat terlarut yang tersedia bagi tanaman dan berperan dalam proses dekomposisi protein dalam tanah,

Table 2. Hasil identifikasi isolat bakteri melalui pendekatan molekuler 16S rDNA
Table 2. Identification results of bacterium isolates with molecular approach of 16S rDNA

| No. | Kode isolat | Hasil identifikasi |
|---|---|---|
| 1 | C1 | *Bacillus amyloliquefaciens* |
| 2 | C4 | *Micrococcus luteus* |
| 3 | C5 | *Cupriavidus gilardii* |
| 4 | D2 | *Bacillus megaterium* |
| 5 | D3 | *Arthrobacter crystallopoietes* |
| 6 | E4 | *Pseudomonas plecoglossicida* |
| 7 | E5 | *Bacillus substilis* |
| 8 | F3 | *Bacillus substilis* |
| 9 | F7 | *Arthrobacter oryzae* |
| 10 | G1 | *Bacillus niacin* |
| 11 | G2 | *Staphylococcus_hominis* |
| 12 | G5 | *Arthrobacter globiformis* |
| 13 | G6 | *Dyella marensis* |
| 14 | G7 | *Microbacterium trichothecanolyticum* |




Gambar 2. Hubungan kekerabatan antar isolat bakteria dari tanah Teluk Kodek, Lombok

Figure 2. Phylogenetic relationship amongst soil bacterium isolates from Teluk Kodek, Lombok

## Kesimpulan

Dari hasil penelitian ini dapat disimpulkan bahwa sampel tanah dari perakaran tanaman di Pulau Lombok memiliki populasi bakteri yang bervariasi. Populasi bakteri tertinggi sebanyak 113 x $10^6$ CFU/g tanah terdapat pada perakaran tanaman *Plumeria acuminata* (kamboja gajah) dan terendah pada tanah yang berada pada perakaran tanaman *Tamarindus indica* sebanyak 34 x $10^5$CFU/g tanah. Empat belas isolat teridentifikasi secara molekuler dengan 16S rDNA dengan genus paling banyak adalah *Bacillus.*

## Daftar Pustaka

Doughari JH. 2006. Antimicrobial activity of Tamarindus indica Linn. Tropical Journal of Pharmaceutical Research. 5(2):597-603.

Durrani, R., M Abubakar, Arshed M.J., Saleha S., Ullah I., Ali Q. 2008. Biological characterization and protein profiles two model bacteria by SDS-PAGE and FT-IR. ARPN *Journal of Agricultural and Biological Scienc*. 3 (5&6) 6-16.

Hasanudin 2003. Peningkatan Peran Mikroorganisme dalam Sistem Pengendalian Penyakit Tumbuhan Secara Terpa

http//www.plasmanutfah.unej.ac.id. Diakses 17 Desember 2010.

Hertiani,T., dan Pratiwi, S.U.T. 2002. Uji Toksisitas Kulit Batang *Phaleria macrocarpa* (Scheff) Boerl. dan Profil KLT Fraksi Aktif, *MFI*. *Pharmacon,* 3: 7-11.

Hougardy A. 2000. *RhodoPseudomonas rhenobacensis* sp. Nov., a new nitrate reducing purple non sulfur

bacterium. *Int J Syst Evol Microbial* 50: 985-992.

Kunitsky C, Osterhout G, Sasser M. 2006. Identification of Micro-organisms using Fatty Acid Methyl Ester (FAME) Analysis and theMIDI Sherlock Microbial Identification System. USA [www.pda.org/bookstore].

Lyla, P. S., dan Ajmal. K. S. 2006. *Marine Microbial Diversity and Ecology*: *Importance and Future Perspectives*. Current Science. 90: 1325 - 1335.

Pitcher DG, Saunders A, Owen RJ. 1989. Rapid extraction of bacterial genomic DNA with guanidium thiocyanate. *J. Applied Microbiology* 8: 151-156.

Purwaningsih S. 2006. Isolasi, enumerasi, dan karakterisasi bakteri rhizobium dari tanah Kebun Biologi Wamena, Papua. *Biodiversitas* 6:82-84.

Purwaningsih, S., Hardiningsih R., Wardah, Sujadi A. 2004. Populasi bakteri dari tanah di desa Tudu_Aog, kecamatan Passi, kabupaten Bolaang Mongondow, Sulut. *Biodiversitas*. 5:13-16.

Reid G, and P. Wong. 2005. Soil bacteria. State of New South Wales. Department of Primary Industries. http://www.dpi.nsw.gov.au/data/assets. Diakses January 2011)

http//www.plasmanutfah.unej.ac.id. Diakses 17 Desember 2010.

Wiley. A.M.J. 1961. Introduction to Soil Microbiology. Japan: Toppan Printing.

**Penelaah Volume 29, September 2011**

Agus Irianto
Agus Nurganto
Dwi Nugroho Wibowo
Husein Sastranegara
Sugiyono
Priyo Susatyo
Pudji Widodo
Uki Awiputranto